

# もやもや病疾患感受性遺伝子RNF213 p.R4859K遺伝子多型マウスにおける血管壁の変化に関する検討

著者	鹿毛 淳史
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16809号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00096811">http://hdl.handle.net/10097/00096811</a>

もやもや病疾患感受性遺伝子  
RNF213 p.R4859K 遺伝子多型マウスにおける  
血管壁の変化に関する検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

神経・感覚器病態学講座神経外科学分野

鹿毛 淳史

## 目次

[1] 要約	3
[2] 研究背景	5
[3] 研究目的	8
[4] 研究方法	8
[5] 研究結果	17
[6] 考察	20
[7] 結論	25
謝辞	26
参考文献	27
図の説明	34
図	38
表	44

## [1] 要約

もやもや病は、両側内頸動脈終末部の進行性の狭窄と、脳底部の異常血管網形成を特徴とする原因不明の疾患である。病理組織学的特徴として、頭蓋内血管の内膜肥厚と中膜菲薄化による血管脆弱性が知られている。また、もやもや病患者における頭蓋内血管の早期変化として血管外径の狭小化が指摘されている。もやもや病患者におけるバイオマーカーの報告は稀であるが、血清マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (Matrix metalloproteinase-9: MMP-9)の発現がもやもや病患者で上昇していることが報告されている。当科ではもやもや病患者の全ゲノム関連解析を行い、疾患感受性遺伝子として17番染色体に存在するRNF213遺伝子のp.R4859K遺伝子多型を同定した。しかし、この遺伝子多型によるもやもや病発症に至る機序は未だ不明である。

本研究ではヒトのRNF213遺伝子p.R4859Kに相同な遺伝子多型を有するRnf213遺伝子p.R4828Kマウスを作製し、Rnf213の遺伝子多型によるもやもや病発症の有無と機序について検証した。

Rnf213遺伝子のp.R4828K遺伝子多型を全身に発現するRnf213ノックインマウス (RNF213-KI) を作成し、生理的状況下におけるもやもや病の発症、ならびにもやもや病に関連する血管病変の有無をそれぞれ検証した。RNF213-KI、野生型マウ



スの両群で、9.4 テスラの Magnetic Resonance Angiography (MRA)を用いて、生後 8 週から 64 週まで同一個体で経時的に Willis 動脈輪周囲の脳血管と異常血管網発達の有無を検証した。墨汁とカルボシアニン色素である DiI の血管内注入による顕微鏡下の観察で、Willis 動脈輪における解剖学的構造と、脳血管末梢における血管吻合の程度について評価した。墨汁染色後の頭蓋内血管の組織切片を作成し、脳底動脈 (Basilar artery: BA)に対する、内頸動脈 (Internal carotid artery: ICA)終末部、中大脳動脈 (Middle cerebral artery: MCA)近位部の血管内・外径を両群間で比較した。また、マウス血漿 MMP-9 の発現を評価するためにゼラチンザイモグラフィを用いた。さらに、血管壁肥厚を誘導する総頸動脈結紮モデルを用いて、総頸動脈の軸位断切片を作製し、肥厚が誘導された内膜と中膜において、Elastica-Masson 染色を用いて病理組織学的構造における変化を評価した。

RNF213-KI は正常に発育し、外表奇形も見られず、野生型マウスと同様の経時的な体重推移を示した (オス;  $p=0.34$ 、メス;  $p=0.47$ )。MRA を用いた評価および墨汁染色後の顕微鏡下の観察において、頭蓋内の血管解剖に野生型との明らかな差は見られず、Willis 動脈輪周囲の動脈狭窄や異常血管網形成を認めなかった。内頸動脈、中大脳動脈の血管内・外径に関しても野生型との明らかな差は見られなかった

(ICA/BA;  $p=0.82$ , MCA/BA;  $p=0.27$ )。血中 MMP-9 活性に関しても、両群間に差を認めなかった ( $p=0.43$ )。

以上の結果から、アジア人もやもや病患者に多く見られる RNF213 遺伝子多型を模した遺伝子を持つ RNF213-KI では、もやもや病の自然発生は認めず、早期変化と考えられる血管外径の狭小化も認めなかった。もやもや病患者に認める血中 MMP-9 の上昇も認めなかった。もやもや病発症には遺伝的要因のみならず、自己免疫応答や炎症、感染、放射線被曝などの環境要因として、二次的要因が寄与している可能性が示唆された。

## [2] 研究背景

もやもや病は、両側内頸動脈終末部の進行性の狭窄・閉塞と脳底部の異常血管網形成を特徴とする疾患である<sup>1-3)</sup>。病理組織学的特徴として、頭蓋内血管の内膜肥厚と中膜菲薄化による血管脆弱性が報告されている<sup>4,5)</sup>。発症の原因は不明であるが、近年は分子生物学的・遺伝学の進歩により関連分子の発現動態や病態生理に関する研究、また発症と関連する遺伝子座に関する研究が飛躍的に進んできた。これまでにもやもや病に関連する遺伝子座として 3p24-p26、6q25、8q23、17q25 が報告されているが

6-9)、近年、17q25 の末端領域に位置する RNF213 遺伝子ともやもや病の疾患感受性遺伝子として同定された<sup>10,11)</sup>。我々は、RNF213 遺伝子 p.R4859K (c.14576G>A) の遺伝子多型が家族性もやもや病の患者の 95% に認められ、また孤発性もやもや病の患者においても 79% に認められることを報告した<sup>10)</sup>。さらにこの遺伝子多型のホモ接合体変異を有するもやもや病患者ではヘテロ接合体変異、野生型を有するもやもや病患者に比べ、早期に発症し、脳梗塞発症が有意に多く、後大脳動脈の狭窄を伴っていることが多いことから重症化と関連することが示されており、予後を予測するバイオマーカーとしても期待されている<sup>12)</sup>。そこで我々は Cre-lox 部位特異的組み換えによって Rnf213 遺伝子で最大のエクソンであるエクソン 32 を欠損させることで Rnf213 遺伝子欠損マウスを作製し、生理的状況下においてもやもや病を発症するか検証した。しかし、このマウスにおいて内頸動脈終末部の狭窄や脳底部の異常血管網の発達は認めなかった<sup>13)</sup>。Rnf213 遺伝子欠損マウスにおいてもやもや病の表現型が得られなかったことから、RNF213 遺伝子 p.R4859K 遺伝子多型は機能喪失型ではなく、機能獲得型の遺伝子変異である可能性が示唆されたが、RNF213 遺伝子多型ともやもや病発症にどのように関与しているか、その機序についてはいまだ不明である。

もやもや病の脳血管像の特徴として当教室の鈴木二郎初代教授らにより発表され

た鈴木分類は広く知られている<sup>1)</sup>。この分類はもやもや病の重症度を示す分類ではなく、病態生理学的な自然経過を示しており、当教室の藤村らは内頸動脈系に依存した状態から外頸動脈系への依存に移行する“Internal Carotid-External Carotid (EC-IC) conversion”という概念を提唱している<sup>14)</sup>。また、もやもや病患者におけるMagnetic resonance image (MRI)の解析により、内頸動脈 (Internal carotid artery: ICA) と中大脳動脈 (Middle cerebral artery: MCA) の外径が、もやもや病患者では動脈硬化による脳血管狭窄患者や健常人と比較して有意に狭小化していることが報告されている<sup>15,16)</sup>。これら頭蓋内血管の血管内・外径の狭小化を示す Constrictive remodeling という現象はもやもや病の病期進行において重要な概念であり、もやもや病患者の極めて早期の変化を表している可能性がある。

もやもや病の病因となるような原因物質は未だ発見されていないが、脳脊髄液中の basic fibroblast growth factor (b-FGF) や血清マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (Matrix metalloproteinase-9: MMP-9) の発現は、もやもや病患者では健常人に比べこれらの値が高いことが知られている<sup>17-20)</sup>。特に MMP-9 活性の上昇は、基底膜の破壊をもたらす血液脳関門の破綻に関与し、臨床的にもやもや病患者において血行再建術後の過灌流による脳出血との関連が示唆されている。

以上のような背景から、RNF213 遺伝子の遺伝子多型によるもやもや病の発症の有無、もやもや病に特徴的な脳血管の解剖学的な変化や、生化学的な変化の有無に関して検討を行った。

### [3] 研究目的

もやもや病の発症における RNF213 遺伝子の機序解明を目的に、ヒト RNF213 遺伝子 p.R4859K 遺伝子多型に相同な変異を有する Rnf213 遺伝子 p.R4859K 遺伝子多型マウス（Rnf213 ノックインマウス: RNF213-KI）を作製し、同マウスにおけるもやもや病の発症の有無ならびにもやもや病に関連する血管病変の有無を明らかにすることである。

### [4] 研究方法

#### （1）実験動物

本研究で使用した動物は東北大学のガイドラインに従って扱われ、動物実験プロトコールは東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認のもとに実施された。動物は自由に飲水と摂食ができる環境で飼育し、照明により 12 時間毎の昼夜の明暗環境に

て飼育された。一連の実験には RNF213-KI と同背景の野生型マウスを用いた。

## (2) RNF213-KI の作製

RNF213-KI は遺伝子ターゲティングを用いて、ヒト RNF213 遺伝子の p.R4859K 遺伝子多型に対応する相同な塩基配列が存在するエクソン 61 にマウス Rnf213 遺伝子の p.R4828K 遺伝子多型を導入することで作製した (図 1A)。ターゲティングベクターには、部位特異的突然変異導入により 4828 番目の AAA トリプレットコドン を AGA と変化させることで、ヒト RNF213 遺伝子の p.R4859K 遺伝子多型と相同な塩基配列となるようにマウス Rnf213 遺伝子の p.R4828 遺伝子多型を導入し、ヒト RNF213 遺伝子の p.R4859K 遺伝子多型に類似する塩基配列を作製した。この導入した遺伝子配列の 5'末端側に loxP 部位で挟み込んだネオマイシン耐性遺伝子と loxP 部位をそれぞれ挿入した。このターゲティングベクターを電気穿孔法で C57BL/6 マウスの胚性幹細胞に導入し、相同組み換えにより Rnf213 遺伝子の一部がターゲティングベクターに置換された塩基配列であるターゲットアレルを持った胚性幹細胞をサザンブロット法によって選別した。選別された胚性幹細胞がターゲットアレルを有することを、特異的なプライマー (フォワードプライマー; 5'-GAAGAAAGGCTAGAC

TGTTTGGTAA-3', リバースプライマー; 5'-TAACAATCCCATTAAGACTGGGTA

A-3') を用いた Polymerase chain reaction (PCR) 産物を直接シーケンスする

ことで確認した。ターゲットアレルを持つ胚性幹細胞を Balb/C マウスの胚盤胞に注

入し、産まれてきた個体の中で毛色がまだらである個体をキメラマウスとして選別し

た。キメラマウスを C57BL/6 マウスと交配し、産まれてきた個体の中で毛色が黒い

個体を、ターゲットアレルを持つマウスとして選別した。p.R4828K 遺伝子多型とネ

オマイシン耐性遺伝子が含まれたターゲットアレルを持つマウスを、Cre リコンビナ

ーゼ遺伝子を CAG プロモーターの下流に発現させた C57BL/6 由来の遺伝子改変マウ

スと交配させることで、Cre-loxP 部位特異的組み換えによってネオマイシン耐性遺伝

子が除去された R4828K 遺伝子多型を持つマウスを得た。このヘテロ接合体ノックイ

ンマウス同士を交配して産まれてきた個体に対し、前述の特異的プライマーを使用し

た PCR 法による遺伝子型判定を行い、ホモ接合体ノックインマウスを RNF213-KI、

ホモ接合型野生型マウスを野生型マウスとして、実験に使用した (図 1B)。

(3) Magnetic resonance angiography (MRA) を用いた頭蓋内主幹動脈の解剖学的評価と血管径評価

頭蓋内主幹動脈を同一個体で経時的に評価する目的で MRA を施行した。磁場強度が 9.4 テスラである小動物用の MRI 装置 (AV400WV、Bruker BioSpin 社製) を用いて、下記の撮像パラメーターによる 3 dimensional time-of-flight (3D TOF)法により、過去に報告された手法に準じて<sup>13,21,22)</sup>、頭部の MRA を撮像した (matrix=256×128、field of view (FOV)=14.9×8.3 mm<sup>2</sup>、slice thickness=8.29 mm、repetition time/echo time (TE/TR)=20/1.847 ms、flip angle=30°、number of averages=1、and scan time=6 min 26 s)。オスの RNF213-KI、野生型マウスを各々 5 匹ずつ、8 週齢から 64 週齢まで 4 週間毎に同様の手法で繰り返し撮影した。撮影時はマウスを自発呼吸下に 2%のイソフルレンの持続吸入で麻酔し、撮影後麻酔から覚醒させた後は引き続き同様に飼育を継続した。頭蓋内主幹動脈の解剖学的構造について、RNF213-KI と野生型マウスの群間における差の有無と、同一個体での経時的推移における変化を、Osirix v3.9.1 32-bit (Pixmeo Sarl, para Apple Macintosh) を用いて定性的に評価した。また、64 週齢での TOF MRA の元画像において、ICA 終末部の血管径と MCA 近位部の血管径それぞれと脳底動脈 (Basilar artery: BA) の血管径比を求めることで、頭蓋内主幹動脈の血管内径を定量的に評価した。これはもやもや病では血管狭窄変化は前方循環と後大脳動脈にきたすことが知られているが、椎骨・脳底動脈に狭窄



をきたすことは極めてまれであり<sup>23)</sup>、内部コントロールとして脳底動脈と ICA、MCA の比を求めることで定量評価を行うためである。以下でも同様に脳底動脈と ICA、MCA の比を求めることで血管径の定量評価を行った。それぞれの測定は 2 人の評価者により独立して行われ、それぞれの値の平均値を解析に用いた。

#### (4) 墨汁と DiI の血管内注入を用いた頭蓋内血管の解剖学的評価と血管径評価

Wills 動脈輪と脳表の細血管の解剖学的評価を行う目的で、墨汁と脂溶性カルボシアニン色素である DiI の血管内注入を過去に報告された手法<sup>24-26)</sup>に準じて行った。墨汁注入群は RNF213-KI、野生型マウス各々 5 匹、DiI 注入群は各群 3 匹ずつとし、64 週齢のオスのマウスを用いて実験を行った。墨汁溶液は墨汁と 20%ゼラチン入り生食を等量混ぜ合わせたものを使用し、DiI 溶液は 0.01 M リン酸緩衝液と 5%グルコース溶液を 1:4 で混ぜ合わせた溶液 10ml に 100%エタノール 16.7 ml に 100 mg の DiI を溶かした溶液 200  $\mu$ l を混ぜ合わせた溶液を使用した。マウスを過剰量のイソフルランで安楽死させ、心腔内注射により 20 ml の冷やした生理食塩水で血管内を還流し、続いて墨汁溶液 0.8 ml を注入した。DiI 染色においては 0.01 M リン酸緩衝液で血管内を灌流し、続いて DiI 溶液 10ml を注入した。その後速やかに脳を摘出し、摘

出した脳を4%パラホルムアルデヒドで固定して、蛍光実体顕微鏡下(M165 FC, Leica, Wetzlar, Germany)に脳底部と脳表の血管を観察した。Willis 動脈輪における解剖学的構造と、脳血管末梢における血管吻合の程度について、RNF213-KI と野生型マウスの群間における差の有無を定性的に評価した。顕微鏡下に ICA 終末部の血管径と MCA 近位部の血管径それぞれと BA の血管径比を求めることで、頭蓋内主幹動脈の血管内径を定量的に評価した。それぞれの測定は2人の評価者により独立して行われ、それぞれの値の平均値を解析に用いた。

#### (5) 頭蓋内血管の組織学的血管径評価

墨汁注入後の脳を、0.01 M リン酸緩衝液に30%アルブミン、0.5%ゼラチンを溶かしたゲルに包埋し、脳血管の外径を評価するために脳の冠状断切片を作成した。ビブラトーム (LinearSlicer pro 10, Dosaka, Kyoto, Japan) を用いて、30 $\mu$ m の厚さで連続切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。血管の軸位断において ICA、BA の外径を、血管の水平断において MCA の最大径を MCA の外径として、頭蓋内血管の外径を測定した。測定には Image J, version 1.48e (National Institutes of Health) を使用し、それぞれの測定は2人の評価者により独立して行われ、それ

それぞれの値の平均値を解析に用いた。

#### (6) ゼラチンザイモグラフィー

もやもや病患者では血清 MMP-9 の発現が健常人に比べ上昇していることが知られている<sup>19,20)</sup>。そこで、RNF213-KI、野生型マウスにおける血中の pro-MMP-9 と MMP-9 活性を検討するために、マウス血漿を用いてゼラチンザイモグラフィーを行った。8 週齢から 10 週齢のオスのマウス、各群 5 匹ずつ使用し、過剰量のイソフルランによる安楽死後、ヘパリン入りチューブに心臓血を採取した。サンプルを 4°C、1000 g で 10 分間遠心し、血漿を採取した。採取した血漿をゼラチンザイモグラフィーキット (AK47, Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を使用し、マニュアルに従い以下の手順でゼラチンザイモグラフィーを行った。血漿を付属のサンプルバッファーと混ぜ、室温で 15 分反応させ、プレキャストゲルと付属のランニングバッファーを 10 倍希釈して使用し、125V の定電圧で電気泳動し、付属の洗浄液を 10 倍に希釈して、室温で 1 時間振盪させながらゲルを洗浄した。その後付属の酵素反応液に浸し、37°C で 26 時間反応させた。続いて付属の染色液を用いてタンパク染色を行い、5%酢酸、30%メタノールの脱色液で脱色した。画像は ChemiDoc MP ImageLab PC system (BioRad, CA, USA)

を用いて撮影し、解析した。pro-MMP-9 と MMP-9 の発現量を、野生型マウスに対する RNF213-KI の相対値で求めることで半定量的評価を行った。

#### (7) 血管壁肥厚モデル

RNF213 遺伝子多型の遺伝的背景をもつマウスにおいて、さらに血行力学的因子を加え血管壁の病理組織学的変化を検証する目的で、血管壁の肥厚を誘導するモデルであり、マウスの血管リモデリングに関する研究で汎用されている、片側総頸動脈結紮を行った<sup>13,27)</sup>。8 週齢から 10 週齢のオスの RNF213-KI と野生型マウスを各々 6 匹ずつ使用し、30%酸素と 70%一酸化窒素の混合ガスにイソフルレンを 1.5%で混合した吸入麻酔にて、自発呼吸下に麻酔した。術中は保温器 (BWT-100, Bio Research Center, Nagoya, Japan)にて直腸温を  $37\pm0.5$  °C に維持した。マウスを仰臥位に固定し、下顎から胸骨にかけて正中切開を置き、顕微鏡下に左総頸動脈を露出した。迷走神経を損傷しないように総頸動脈と鈍的に剥離し、左総頸動脈を露出した。左総頸動脈の、左内頸動脈と左外頸動脈の分岐直前の部位で、6-0 絹糸を用いて左総頸動脈を結紮し、皮膚を 6-0 ナイロン糸で閉創した。麻酔から覚醒させた後は引き続き同様に飼育を継続した。

#### （８）組織学的な血管壁の評価

左総頸動脈結紮直後ならびに施行から 7、14、21、28 日後のマウスをそれぞれ過剰量のイソフルレンを用いて安楽死させ、心腔内注射により冷生理食塩水で血管内を灌流し、続いて 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。左総頸動脈を摘出し、パラフィン包埋し、過去の報告された手法に準じて<sup>13)</sup>、結紮部位から中枢側に 2.0 mm、2.5 mm、3.0 mm の部位で、それぞれ厚さ 3  $\mu$ m の軸位断切片を作製した。作製した切片を Elastica-Masson 染色し、動脈壁内における弾性板を同定した。過去に報告された定義<sup>27)</sup>に基づき、内膜と中膜を同定し、それぞれの断面積を測定した。各個体で、前述の 3 部位においてそれぞれ内膜および中膜の断面積を測定し、これら 3 部位の平均値を測定した。

#### （９）統計解析

結果は平均±標準偏差（S.D.）にて表し、有意水準は  $p < 0.05$  とした。経時的体重変化と経時的血管壁の厚さにおける多群間解析は反復測定 2 元配置分散分析で検討後、Bonferroni post-hoc 分析を用いて比較検定した。脳血管内・外径の評価、ゼラ

チンザイモグラフィーは t 検定で評価した。全ての統計解析は Graph Pad Prism 5.03 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。

## [5] 研究結果

### (1) Rnf213 ノックインマウスの一般的性質

ホモ接合体ノックインマウスとヘテロ接合体ノックインマウスはともに正常な繁殖と発育を示し、外表奇形も認めず、体重増加も野生型マウスと比較して有意な差は認めなかった (図 2)。全身臓器の HE 染色による組織学的検討においても異常認めなかった。

### (2) MRA を用いた頭蓋内主幹動脈の評価

8 週齢から 64 週齢までの同一個体での MRA フォローアップにおいて、RNF213-KI と野生型マウスの間に、頭蓋内主幹動脈における解剖学的構造の差は指摘できなかった (図 3)。RNF213-KI の MRA 所見において、内頸動脈終末部を含めた主幹動脈の狭窄所見や、脳底部の異常血管網形成をはじめとする血管構造の経時的変化は見られなかった (図 3)。

### （３）墨汁と DiI の血管内注入を用いた頭蓋内血管の評価

64 週齢のマウスにおいて、墨汁と DiI の血管内注入後の顕微鏡下の観察では、RNF213-KI と野生型マウスの間に、Willis 動脈輪における解剖学的血管構造の差は認めなかった（図 4A, B）。RNF213-KI において、脳底部異常血管網の形成および内頸動脈終末部の明らかな狭窄病変および閉塞病変は指摘できなかった。脳血管末梢における脳表血管吻合の発達の程度についても、RNF213-KI と野生型マウスの間には認めなかった（図 4C, D）。

### （４）頭蓋内血管内・外径の評価

TOF MRA と墨汁注入後の頭蓋内血管径を顕微鏡下に計測することで、頭蓋内血管の内径を、頭蓋内血管の組織学的検討により頭蓋内血管の外径を評価した。RNF213-KI と野生型マウスの群間で有意な差は認めなかった（表）。もやもや病における極めて早期の変化と考えられる脳血管の内・外径の狭小化は RNF213-KI において認めなかった。

#### (5) 血中 MMP-9 測定

もやもや病患者におけるバイオマーカーとして、血清 MMP-9 がもやもや病患者では健常人に比べ上昇しており、血液脳関門の脆弱性に関与していると考えられている。ゼラチンザイモグラフィーを用いて、マウス血漿の pro-MMP-9 と MMP-9 を測定し、各々 105 kDa と 86 kDa に検出された (図 5)。野生型マウスのバンドのシグナル強度に対する RNf213-KI のバンドのシグナル強度を求めることで半定量したが、pro-MMP-9、MMP-9 とともに有意な差は認めなかった (pro-MMP-9;  $p=0.70$ , MMP-9;  $p=0.73$ ) (図 5)。

#### (6) 血管壁肥厚モデルにおける病理組織学的評価

総頸動脈結紮直後の総頸動脈において、RNf213-KI と野生型マウスの間で、血管壁の構造に明らかな差を認めなかった (図 5-C-A, F)。総頸動脈結紮の施行後は、過去に報告された所見<sup>13,28)</sup>と同様に内膜および中膜の一過性肥厚を認め、その肥厚は内膜、中膜ともに結紮の 14 日後において最も顕著であった (図 5 A, B)。しかし、RNf213-KI と野生型マウスの群間で、内膜と中膜の肥厚に有意な差は見られなかった (内膜;  $p=0.48$ , 中膜;  $p=0.44$ )。



## [6] 考察

本研究では、もやもや病感受性遺伝子である RNF213 遺伝子の遺伝子多型において、東アジアのもやもや病患者に多く見られる RNF213 遺伝子 p. R4859K (c.14576G>A) 遺伝子多型に相同な Rnf213 遺伝子 p.R4828K 遺伝子多型マウスを作製し、もやもや病で見られる両側内頸動脈終末部の狭窄および閉塞や脳底部異常血管網の形成をはじめとする頭蓋内血管の異常が、生理的状況下において観察されるかどうかを検証した。RNF213-KI は正常に発育し、64 週齢までに自然経過でのもやもや病の発症は認めず、MRA 所見と顕微鏡下の観察における Willis 動脈輪や脳動脈末梢の脳表血管吻合の発達程度といった脳血管解剖に野生型マウスとの明らかな差を認めなかった。頸動脈に関する病理組織学的検討においても、RNF213-KI は生理的状況下では、内膜肥厚や中膜菲薄化といったもやもや病に特徴的な所見は認められなかった。これらの結果から、RNF213 遺伝子 p.R4859K 遺伝子多型のみではもやもや病の発症には至らず、遺伝子変異がもやもや病発症の十分条件ではないことが示された。

RNF213 遺伝子における c.14576G>A の遺伝子多型は日本人の 1%に存在する<sup>11)</sup>と推測されている一方で、もやもや病の国内の発生率は人口 10 万人当たり 0.35-1.13 人

と低く<sup>29-31)</sup>、もやもや病において RNF213 遺伝子多型は低い浸透率であることが示されている。この結果から RNF213 遺伝子に遺伝子多型があるという遺伝背景のみではもやもや病を発症せず、本研究において RNF213 遺伝子多型を持つマウスで表現型が得られなかったことは想定できたことであり、もやもや病の発症に至るには遺伝的背景に加えて自己免疫反応<sup>32,33)</sup>、感染や炎症<sup>34)</sup>、放射線被曝<sup>35)</sup>、虚血など何らかの追加の要因を要する可能性が考えられた。

ヒト RNF213 遺伝子のエクソン 60 上の p.R4859K 遺伝子多型によるもやもや病発症の機序解明のため、細胞外基質の膜タンパクである MMP-9 と頭蓋内血管径に関して詳細な検討を行った。先の研究においてもやもや病患者では血清 MMP-9 の発現が健常人に比べ上昇していることが報告されているが<sup>19,20)</sup>、本研究では生理的状況下で Rnf213 ノックインマウスの血中 MMP-9 発現に、有意な上昇は認められなかった。

マウス脳脊髄液の採取は困難であることから、本研究ではもやもや病患者の脳脊髄液中で上昇していると報告のある b-FGF に関しては評価を行わなかった。また、もやもや病患者における頭部 MRI の解析により、もやもや病患者では ICA と MCA の外径が、動脈硬化による脳血管狭窄患者や健常人と比較して有意に狭小化しており、この頭蓋内血管の血管内・外径の狭小化を示す Constrictive remodeling という現象は

もやもや病の早期変化を表し、病期進行において重要な概念である<sup>15,16)</sup>。本研究では64週齢のマウスでも、頭蓋内血管の血管内・外径の狭小化は認められず、もやもや病の早期の血管形態変化も認めなかった。RNF213のmRNAは脾臓、白血球、リンパ節といった免疫系の組織に多く発現しており、多核球、単核球のどちらの細胞にも発現し、リンパ球ではBリンパ球、Tリンパ球共に発現している<sup>10)</sup>。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞にも発現が見られ、胎児組織では白血球や胸腺に発現が多く見られた<sup>10)</sup>。また、Okamiらはオリゴマイクロアレイ遺伝子発現解析、遺伝子オントロロジー解析により、RNF213遺伝子は抗原提示細胞の遊走や、白血球の成熟といった免疫機能に関わる可能性を示唆している<sup>36)</sup>。RNF213の機能や転写産物、免疫応答を含めたRNF213遺伝子多型により引き起こされる変化に関して、RNF213-KIやRNF213ノックアウトマウスに免疫賦活や免疫抑制を加えることで、もやもや病の表現型の有無や遺伝子の関与が明らかになる可能性があり、今後更なる研究を要する。

RNF213遺伝子の生理的な役割およびRNF213遺伝子の遺伝子多型がどのような経路を介してもやもや病の発症を誘導するかはいまだ不明である。先の報告によると、RNF213遺伝子にホモ接合体のc.14576G>A遺伝子多型が存在する患者では急速に頭蓋内血管の狭窄が進行し、有意に早期発症および脳梗塞の重症化を呈することが報

告されているが<sup>12)</sup>、背景にある病態は不明である。十分に側副血行路が発達するまでに、急速に進行する頭蓋内血管の狭窄・閉塞をきたすことにより脳梗塞は広範で重度となる。したがって、RNF213 遺伝子の p.R4859K (c.14576G>A) 遺伝子多型は血管の狭窄・閉塞と血管新生に関与していることが示唆される。RNF213 遺伝子のノックダウンやノックアウト動物を用いた先行研究は、この重要な問題解決の糸口なる可能性がある。Liu らは、RNF213 遺伝子のノックダウンにより RNF213 の機能欠損したゼブラフィッシュにおいて頭部血管の発生に異常があることを報告しており<sup>11)</sup>、RNF213 遺伝子が頭蓋内の血管新生における新たなシグナリング経路に関与している可能性が考えられている。さらに当教室において、RNF213 ノックアウトマウスで、血管壁肥厚モデルである総頸動脈結紮を行ったところ、結紮の 14 日後において RNF213 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して有意に中膜が薄く、血管壁では MMP-9 の発現が RNF213 ノックアウトマウスで野生型マウスに比較して有意に上昇していることを報告している<sup>13,37)</sup>。また、RNF213 ノックアウトマウスでは虚血後の血管新生が亢進していることも報告している<sup>38)</sup>。これらの所見は頭蓋内血管の中膜菲薄化や異常血管網増生というもやもや病に特徴的な所見と矛盾しない結果が得られた。我々の結果に基づくと、RNF213 遺伝子における c.14576G>A 遺伝子多型

が RNF213 遺伝子の機能喪失変異である可能性が示唆された。本研究では、もやもや病患者の RNF213 遺伝子多型と相同のマウス Rnf213 遺伝子の p.R4828K (c. 14484G>A) 遺伝子多型を有する Rnf213-KI を用いて、血管壁肥厚モデルを検証したが、血管壁のリモデリングにおいて、野生型マウスに比べ有意な差は認めなかった。したがって、Rnf213 遺伝子の p.R4828K (c. 14484G>A) 遺伝子多型は機能獲得変異ではない可能性が示唆された。一方でヒトとマウスでは RNF213 の塩基配列やタンパク質にわずかな構造的な差があり、Rnf213 遺伝子の p.R4828K (c. 14484G>A) 遺伝子多型が RNF213 遺伝子の p.R4859K (c. 14576G>A) 遺伝子多型を正確に反映していない可能性は完全に否定できない。RNF213 タンパクは 5256 のアミノ酸からなるタンパクで、ユビキチンリガーゼ活性を持つ ring finger ドメインと 2 つの AAA+ ATP 分解機能を有する新たらしいタイプのタンパクで E3 リガーゼの仲間であることが報告されているが<sup>10,11,39)</sup>、今後は RNF213 遺伝子改変マウスのプロテオソーム解析など網羅的解析を行うことなど、より詳細な RNF213 タンパクの解析が必要である。

本研究の限界として、ヒトとマウスという種の違いにより、塩基配列やタンパク質の構造にわずかな差があり、ヒトの一塩基多型がマウスの一塩基多型で正確に反映されるかは不明である。また、灌流固定時に冷生食を使用することで血管が収縮し、生

理的な条件を正確には反映できていない可能性があげられる。マウス体温と同じ温度の生理食塩水やパラホルムアルデヒドを用いることでより生理的な条件に近づけることが可能となるため、血管径評価の際には温生食の方が望ましい。本研究では血管壁の断面積を積分することで血管壁の厚さを評価しているため、血管が収縮したことによる血管壁の厚さへの影響は少ないと考えられる。さらに、本研究ではヒト RNF213 遺伝子の pR4859K (c.14576G>A) 遺伝子多型に相同なマウス Rnf213 遺伝子の p.R4828K (c. 14484G>A) 遺伝子多型を導入したが、もやもや病に関連した RNF213 の一塩基多型は他にも報告がある<sup>10,11,40)</sup>。それらの一塩基多型の機能を事前に予測し、最もタンパク構造の変化をきたす可能性が高いものやそれらの組み合わせの遺伝子多型の導入を検討する必要があった。

## [7] 結論

RNF213 遺伝子の pR4859K (c.14576G>A) 遺伝子多型に相同な、Rnf213 遺伝子の p.R4828K (c. 14484G>A) 遺伝子多型を有する RNF213-KI は正常に発育し、自然経過でのもやもや病の発症は認めなかった。RNF213 遺伝子多型のみではもやもや病の発生に不十分であり、遺伝的背景に加えて免疫応答、感染、炎症、放射線被曝などの多

要因が加わることにより、もやもや病が発症すると推測された。RNF213 遺伝子多型は機能獲得変異か機能喪失変異であるか確定はできず、さらなる研究が求められる。

## 謝辞

本研究は著者が東北大学大学院医学系研究科後期博士課程在学中に、同大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態講座神経病態制御学分野の藤村幹准教授の御指導のもと行ったものである。本研究ならびに博士論文作成に際し、多大なる御指導と御協力を賜りました、藤村幹准教授と同大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態講座神経外科学分野の冨永悌二教授に対し、厚く御礼申し上げます、深謝申し上げます。

Rnf213 ノックインマウス作製にあたり御協力を賜りました、同大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野の呉繁夫教授に感謝申し上げます。

最後に本研究にあたり御協力賜りました、同大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態講座神経外科学分野の新妻邦泰先生、伊藤明先生、坂田洋之先生、前田美香先生、東北大学学際科学フロンティア研究所の藤村維子先生に御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. Arch. Neurol. 1969;20(3):288-299.
2. Fujimura M, Tominaga T. Current Status of Revascularization Surgery for Moyamoya Disease: Special Consideration for Its 'Internal Carotid-External Carotid (IC-EC) Conversion' as the Physiological Reorganization System. Tohoku J Exp Med. 2015;236(1):45-53.
3. Research Committee on the Pathology Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis, Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Intractable Diseases. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Moyamoya Disease (Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis). Neurol. Med. Chir. (Tokyo). 2012;52(5):245-266.
4. Oka K, Yamashita M, Sadoshima S, et al. Cerebral haemorrhage in Moyamoya disease at autopsy. Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol. 1981;392(3):247-261.



5. Takagi Y, Kikuta K, Nozaki K, et al. Histological features of middle cerebral arteries from patients treated for Moyamoya disease. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 2007;47(1):1-4.
6. Ikeda H, Sasaki T, Yoshimoto T, et al. Mapping of a familial moyamoya disease gene to chromosome 3p24.2-p26. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;64(2):533-537.
7. Inoue TK, Ikezaki K, Sasazuki T, et al. Linkage analysis of moyamoya disease on chromosome 6. *J. Child Neurol.* 2000;15(3):179-182.
8. Yamauchi T, Tada M, Houkin K, et al. Linkage of familial moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis) to chromosome 17q25. *Stroke*. 2000;31(4):930-935.
9. Sakurai K, Horiuchi Y, Ikeda H, et al. A novel susceptibility locus for moyamoya disease on chromosome 8q23. *J. Hum. Genet.* 2004;49(5):278-281.
10. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J. Hum. Genet.*

2011;56:34-40.

11. Liu W, Morito D, Takashima S, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. PLoS One. 2011;6(7):e22542.
12. Miyatake S, Touho H, Miyake N, et al. Sibling cases of moyamoya disease having homozygous and heterozygous c.14576G>A variant in RNF213 showed varying clinical course and severity. J. Hum. Genet. 2012;57:804-806.
13. Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, et al. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213: A susceptibility gene for moyamoya disease. Brain Res. 2014;1552:64–71.
14. Fujimura M, Tominaga T. Lessons learned from moyamoya disease: outcome of direct/indirect revascularization surgery for 150 affected hemispheres. Neurol. Med. Chir. (Tokyo). 2012;52(5):327-332.
15. Kaku Y, Morioka M, Ohmori Y, et al. Outer-diameter narrowing of the

- internal carotid and middle cerebral arteries in moyamoya disease detected on 3D constructive interference in steady-state MR image: is arterial constrictive remodeling a major pathogenesis? *Acta Neurochir. (Wien.)*. 2012;154:2151-2157.
16. Yuan M, Liu ZQ, Wang ZQ, et al. High-resolution MR imaging of the arterial wall in moyamoya disease. *Neurosci Lett*. 2015;584:77-82.
  17. Takahashi A, Sawamura Y, Houkin K, et al. The cerebrospinal fluid in patients with moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis) contains high level of basic fibroblast growth factor. *Neurosci Lett*. 1993;160(2):214-216.
  18. Yoshimoto T, Houkin K, Takahashi A, et al. Angiogenic factors in moyamoya disease. *Stroke*. 1996;27(12):2160-2165.
  19. Fujimura M, Watanabe M, Narisawa A, et al. Increased expression of serum Matrix Metalloproteinase-9 in patients with moyamoya disease. *Surg. Neurol*. 2009;72:476-480; discussion 480.
  20. Kang H-S, Kim JH, Phi JH, et al. Plasma matrix metalloproteinases,

- cytokines and angiogenic factors in moyamoya disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010;81:673-678.
21. Brubaker LM, Bullitt E, Yin C, et al. Magnetic Resonance Angiography Visualization of Abnormal Tumor Vasculature in Genetically Engineered Mice. *Cancer Res*. 2005;65(18):8218-8223.
  22. Figueiredo G, Brockmann C, Boll H, et al. Comparison of Digital Subtraction Angiography, Micro-Computed Tomography Angiography and Magnetic Resonance Angiography in the Assessment of the Cerebrovascular System in Live Mice. *Clin. Neuroradiol*. 2012;22(1):21-28.
  23. Miyamoto S, Kikuchi H, Karasawa J, et al. Moyamoya disease associated with bilateral occlusion of the vertebral artery. *Surg. Neurol*. 1984;22(1):21-28.
  24. Maeda K, Hata R. Differences in the cerebrovascular anatomy of C57Black / 6 and SV129. 1998;9:1317-1319.
  25. Li Y, Song Y, Zhao L, et al. Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye DiI. *Nat. Protoc*. 2008;3(11):1703-1708.

26. Hasan MR, Herz J, Hermann DM, et al. Visualization of macroscopic cerebral vessel anatomy--a new and reliable technique in mice. *J Neurosci Methods*. 2012;204(2):249-253.
27. Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1997;17(10):2238-2244.
28. Godin D, Ivan E, Johnson C, et al. Remodeling of Carotid Artery Is Associated With Increased Expression of Matrix Metalloproteinases in Mouse Blood Flow Cessation Model. *Circulation*. 2000;102:2861-2866.
29. Wakai K, Tamakoshi A, Ikezaki K, et al. Epidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide survey. *Clin. Neurol. Neurosurg*. 1997;99 Suppl 2:S1-5.
30. Kuriyama S, Kusaka Y, Fujimura M, et al. Prevalence and clinicoepidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Stroke*. 2008;39(1):42-47.
31. Hayashi K, Horie N, Suyama K, et al. An epidemiological survey of

- moyamoya disease, unilateral moyamoya disease and quasi-moyamoya disease in Japan. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2013;115(7):930-933.
32. Kim SJ, Heo KG, Shin HY, et al. Association of thyroid autoantibodies with moyamoya-type cerebrovascular disease: a prospective study. *Stroke.* 2010;41(1):173-176.
33. Li H, Zhang ZS, Dong ZN, et al. Increased thyroid function and elevated thyroid autoantibodies in pediatric patients with moyamoya disease: a case-control study. *Stroke.* 2011;42(4):1138-1139.
34. Czartoski T, Hallam D, Lacy JM, et al. Postinfectious vasculopathy with evolution to moyamoya syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2005;76(2):256-259.
35. Manion B, Sung WS. Radiation-induced moyamoya disease after childhood astrocytoma. *J. Clin. Neurosci.* 2011;18(10):1403-1405.
36. Okami N, Aihara Y, Akagawa H, et al. Network-based gene expression analysis of vascular wall of juvenile Moyamoya disease. *Childs Nerv. Syst.* 2015;31(3):399-404.

37. Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, et al. Increased vascular MMP-9 in mice lacking RNF213: moyamoya disease susceptibility gene. *Neuroreport*. 2014;25(18):1442-1446.
38. Ito A, Fujimura M, Niizuma K, et al. Enhanced post-ischemic angiogenesis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res*. 2015;1594:310-320.
39. Morito D, Nishikawa K, Hoseki J, et al. Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Sci. Rep*. 2014;4:4442.
40. Moteki Y, Onda H, Kasuya H, et al. Systematic Validation of RNF213 Coding Variants in Japanese Patients With Moyamoya Disease. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(5).

## 図の説明

### 図 1

RNF213-KI の獲得に至る過程を示す。(A) RNF213-KI の遺伝子構造に関する模

式図である。Cre-lox 部位特異的組み換えの結果として、RNF213-KI では Rnf213 遺伝子のエクソン 61 に p.R4828K 遺伝子多型が挿入されている。(B) 遺伝子型の確認のため施行した PCR 産物の電気泳動の写真である。左から順に、DNA ラダーマーカー、ヘテロ接合体 Rnf213 ノックインマウス、野生型マウス、ホモ接合体 Rnf213 ノックインマウスの結果である。

## 図 2

RNF213-KI と野生型マウスのオス (A) とメス (B) の経時的な体重の推移を示す。

RNF213-KI と野生型マウスの間に有意な差は見られない。

## 図 3

9.4 テスラの MRA による頭蓋内血管の経時的变化を示す。RNF213-KI (A, B, C) と野生型マウス (D,E,F) において、8 週齢 (A, D)、40 週齢 (B, E) と 64 週齢 (C, F) の MRA を示す。頭蓋内主幹動脈における解剖学的構造および血管径について、RNF213-KI と野生型マウスの間に明らかな差は見られない。



#### 図 4

64 週齢のマウスにおいて、DiI 注入後の大脳皮質 (A, B) と墨汁注入後の脳底部 (C, D) の実体顕微鏡写真を示す。RNF213-KI (A, C) と野生型マウス (B, D) において、脳血管末梢における脳表血管吻合の程度と Willis 動脈輪における解剖学的構造について、RNF213-KI と野生型マウスの間に明らかな差は見られない。(A, B) のスケールバーは 2 mm、(C, D) のスケールバーは 500  $\mu\text{m}$  である。

#### 図 5

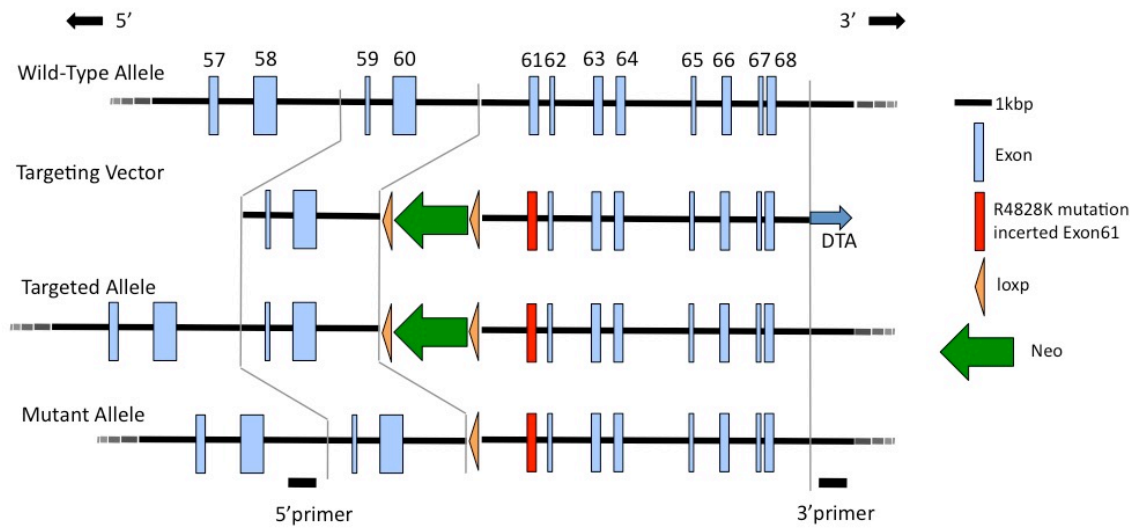
マウス血漿中の pro-matrix metalloproteinase (pro-MMP)-9 および MMP-9 発現の検討を示す。各群 5 匹ずつで検討した。(A)ゼラチンザイモグラフィー。Pro-MMP-9 および MMP-9 は各々 105 kDa と 86 kDa に検出された。(B) pro-MMP-9 の半定量的結果を示す。RNF213-KI と野生型マウスの間に有意な差は見られない ( $p=0.70$ )。(C) MMP-9 の半定量的結果を示す。RNF213-KI と野生型マウスの間に有意な差は見られない ( $p=0.73$ )。

#### 図 6

総頸動脈結紮（CCAL : common carotid artery ligation）から 0、7、14、21、28 日後の総頸動脈の内膜（A）と外膜（B）の面積と、400 倍拡大の経時的な軸位断切片（Elastica-Masson 染色）（C）を示す。RNF213-KI と野生型マウスでともに結紮の 14 日後において最も内膜と中膜が肥厚しているが、RNF213-KI と野生型マウスの間に有意な差は見られない（内膜;  $p=0.48$ , 中膜;  $p=0.44$ ）。

# 图 1

A



B



図2

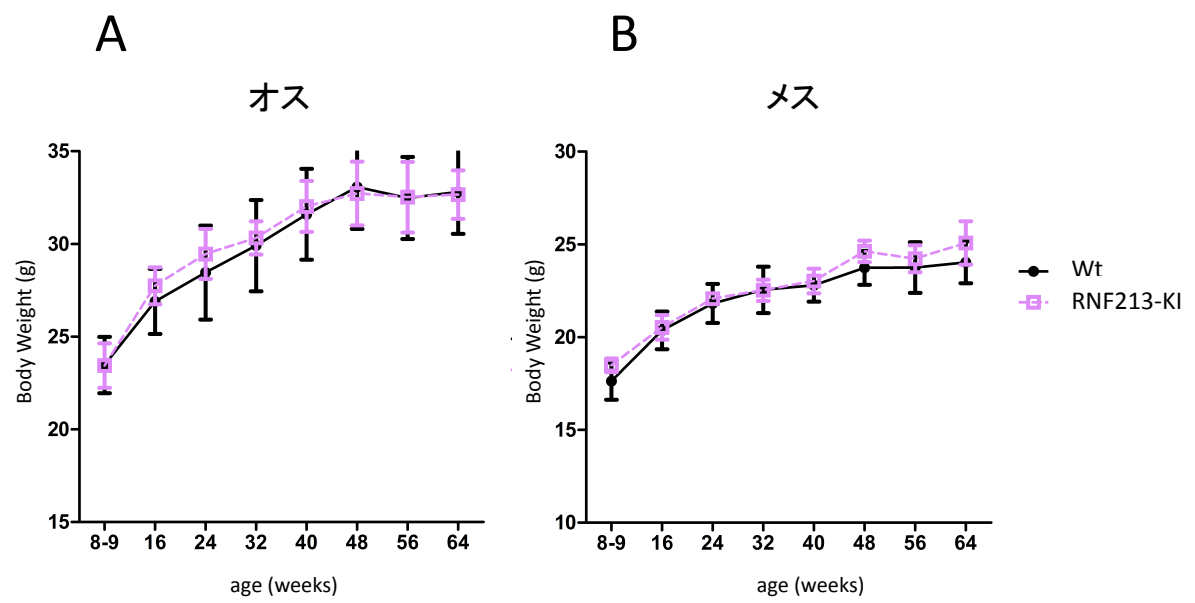


图3

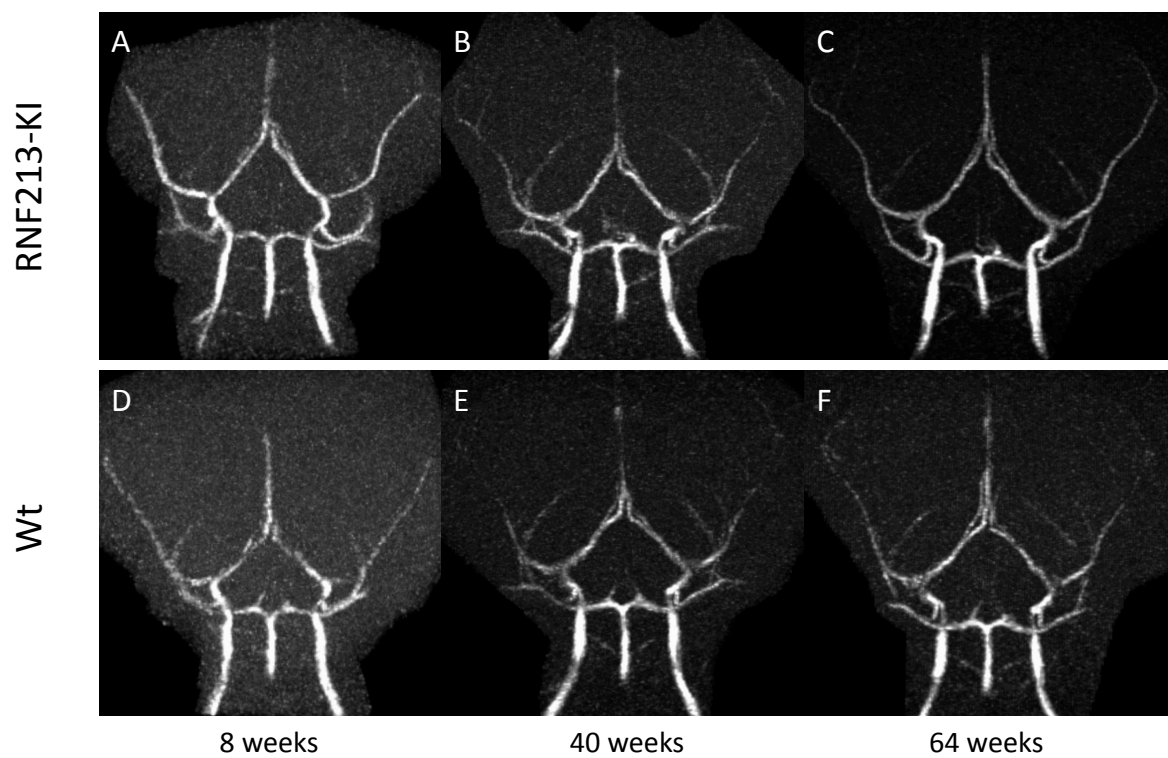
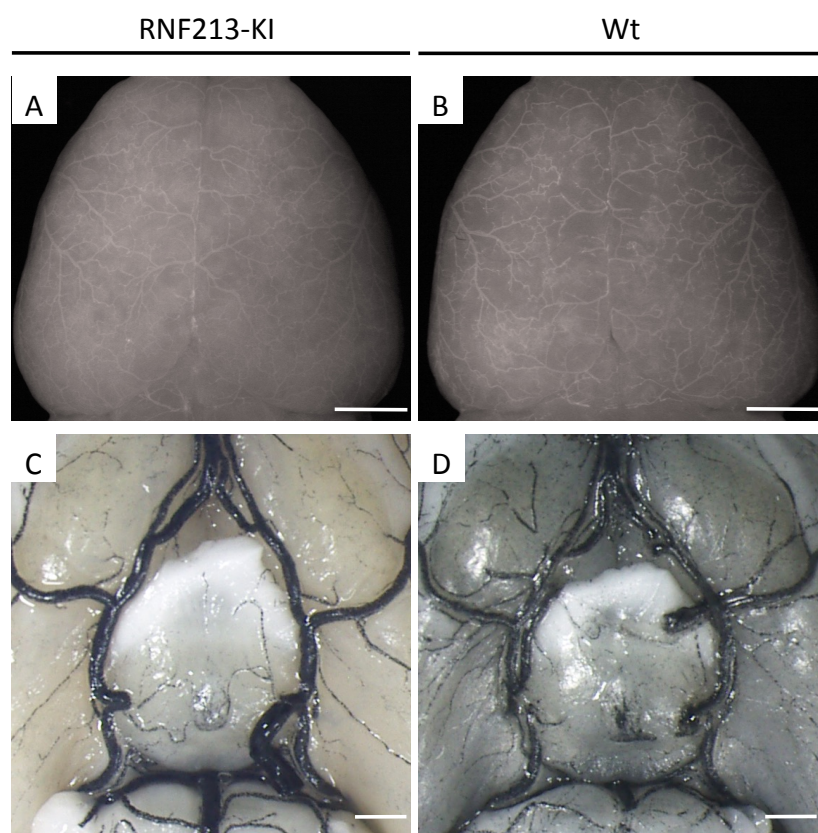
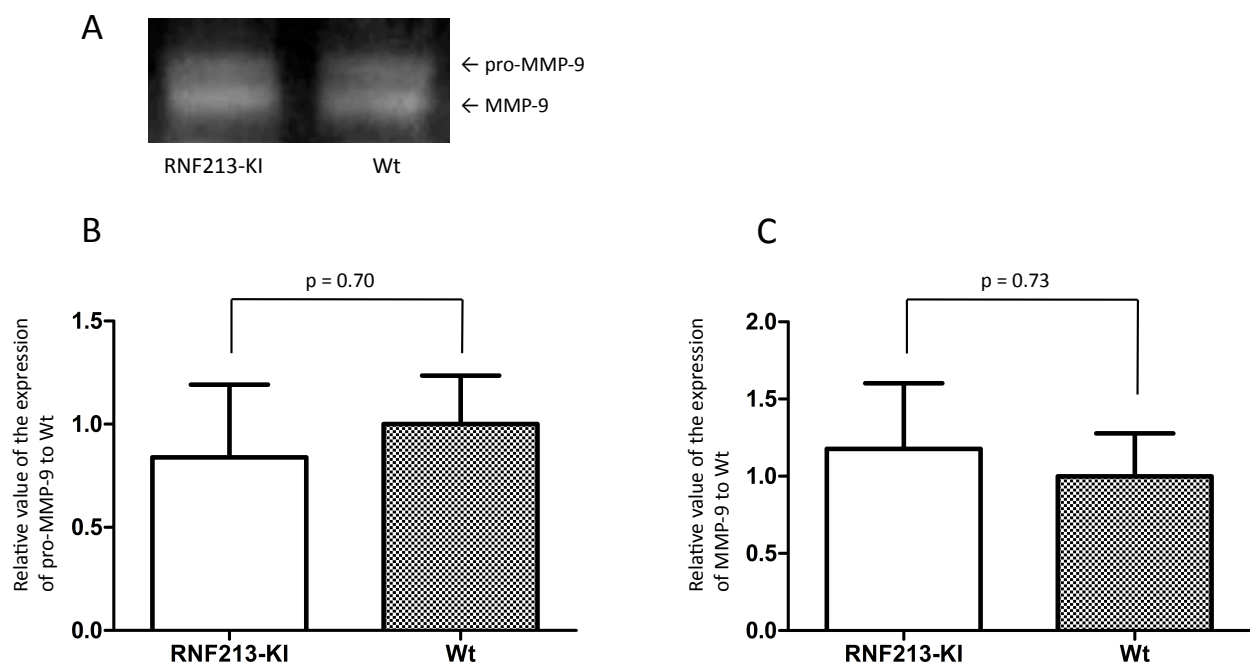


图4



# 図5



# 図6

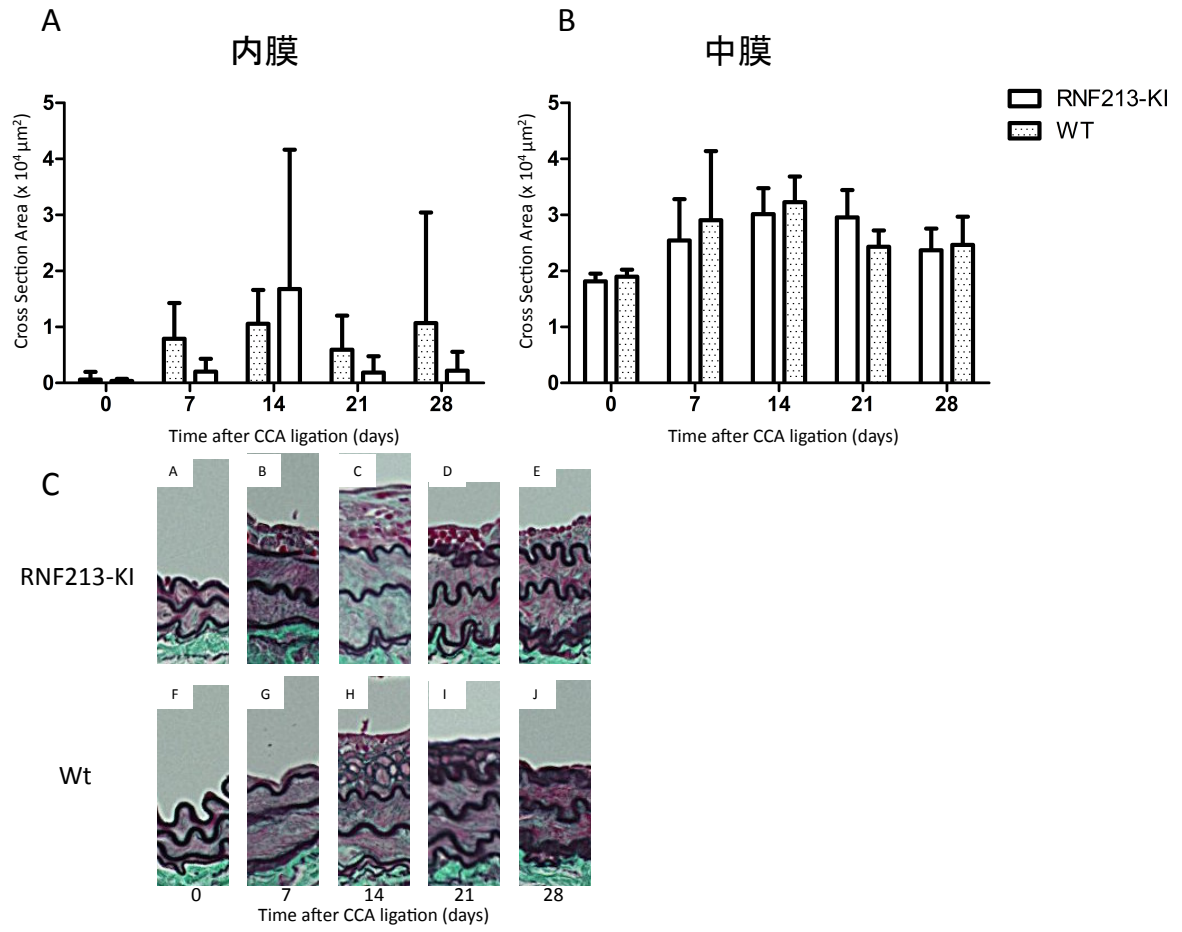




表 墨汁、MRA、組織における内頸動脈径と中大脳動脈径の椎骨動脈径に対する比

		RNF213-KI	Wt	<i>p</i> value
墨汁	ICA/BA (%)	75.2 ± 2.8	70.5 ± 15.2	0.62
(血管内径)	MCA/BA (%)	66.8 ± 3.5	58.7 ± 22.7	0.27
MRA	ICA/BA (%)	97.9±7.9	92.8±12.4	0.45
(血管内径)	MCA/BA (%)	78.1±2.8	77.2±3.4	0.67
組織	ICA/BA (%)	95.3 ± 13.7	91.9 ± 11.2	0.82
(血管外径)	MCA/BA (%)	71.6 ± 7.1	76.9 ± 8.0	0.27

値は平均±標準偏差を表す。

表中の略語は以下のとおり。

MRA; magnetic resonance angiography、RNF213-KI (Rnf213 ノックインマウス)、

Wt (野生型マウス)、BA (basilar artery; 脳底動脈)、ICA (internal carotid artery;

内頸動脈)、MCA (middle cerebral artery; 中大脳動脈)